

Contribution à la mise au point
d'une méthode d'obtention
de poissons ovovivipares
axéniques

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD de LYON
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 21 décembre 1977
pour obtenir le grade de Docteur-Vétérinaire

par

Philippe DUBOURGET

né le 19 février 1954
à Is-sur-Tille (Côte-d'Or)



Contribution à la mise au point d'une méthode d'obtention de poissons ovovivipares axéniques

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD de LYON
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 21 décembre 1977
pour obtenir le grade de Docteur-Vétérinaire

par

Philippe DUBOURGET

né le 19 février 1954

à Is-sur-Tille (Côte-d'Or)



Contribution à la mise au point
d'une méthode d'obtention
de poissons ovovivipares
axéniques

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD de LYON
(Médecine Pharmacie)

et soutenue publiquement le 21 décembre 1977
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Philippe BOURGET



né le 19 février 1952
à Is-sur-Tille (Côte-d'Or)



PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

— DIRECTEUR Monsieur le Professeur FROGET
— DIRECTEURS HONORAIRES Messieurs les Professeurs TAPERNOUX, FLORIO.

— PROFESSEURS

- 1 — Pharmacie et Toxicologie
- 2 — Anatomie descriptive - Extérieur - Anatomie appliquée
- 3 — Physiologie - Thérapeutique - Pharmacodynamie
- 4 — Histologie - Embryologie - Anatomie pathologique
- 5 — Hygiène et Industrie des aliments d'origine animale
- 6 — Parasitologie et Maladies parasitaires
- 7 — Pathologie médicale des équidés et des carnivores - Législation vétérinaire
- 8 — Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour
- 9 — Technique Chirurgicale - Pathologie Chirurgicale
- 10 — Obstétrique - Pathologie de la Reproduction
- 11 — Pathologie générale - Microbiologie - Immunologie
- 12 — Ethnologie - Zootechnie - Economie Rurale
- 13 — Botanique appliquée - Agronomie - Alimentation
- 14 — Physique et Chimie biologiques et médicales
- 15 — Maladies contagieuses - Zoonoses - Législation sanitaire

M. LORGUE
M. BARONE
M. BOST.
M. LUCAM
M. FLACHAT
M. EUZEBY
M. FONTAINE
M. COTTEREAU
M. COULON
M. BERTRAND
M. OUDAR
M. FROGET
M. WOLTER

M. JOUBERT.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. FERNEY (Détaché à l'Institut des Sciences et Médecine Vétérinaires de DAKAR)
MM. CHANTEGRELET, DELATOUR, DESCHANEL, JEAN-BLAIN, LAPRAS, LE NIHOUANEN.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. BOIVIN, GASTELLU, MOUTHON.

MAITRES – ASSISTANTS

Mme CHAUVÉ, MM. FARGES, FAU, FRANCK, GARNIER, GEVREY, GOUY, KECK, LABE, Mlle LAVAL, MM. LEGEAY, PAYAN,
PRAVE, Mme RACHAIL, M. RICHARD.

ASSISTANTS

MM. BASSIER, BELLI, BILLIONNET, CHERMETTE, CHEVRIER, DEGUELLE, DEVILLE, EUZEBY, GOSSE, HARS, TIANO, VILLON.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président	: M. le Professeur	de la Faculté de Médecine.
Premier assesseur	: M. le Professeur	de l'École Nationale Vétérinaire.
Deuxième assesseur	: M. le Professeur	de l'École Nationale Vétérinaire.

L'Université Claude Bernard (Médecine - Pharmacie) de LYON et l'École Nationale Vétérinaire de LYON déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni improbation.

A MA FEMME,

En témoignage de mon amour.

A MES PARENTS ET BEAUX-PARENTS,

Qu'ils voient dans ce travail un gage de ma
reconnaissance et de mon affection.

A MONSIEUR R.LESEL

de l'Institut National de la Recherche Agronomique
Centre de Recherches Hydrobiologiques de BIARRITZ
Laboratoire d'Ecologie des Microorganismes

En lui exprimant toute notre gratitude pour
l'aide précieuse et compétente qu'il nous a
apportée.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J.CUDAR

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

Qui nous a donné les moyens de réaliser ce
travail. Qu'il accepte nos remerciements
pour l'aide dont il nous a fait bénéficier.

A MADAME E.SAINSON

du Service de Pathologie Générale

Qui nous a toujours prêté l'aide nécessaire
à la réalisation de ce travail.
Sincères remerciements.

A MESSIEURS LES MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur A.BERTOYE

de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON

En remerciement du grand honneur qu'il nous
fait en acceptant la présidence de notre jury
de thèse. Nos hommages respectueux.

Monsieur le Maître de conférences agrégé G.MOUTHON

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

Qui a bien voulu accepter le sujet de notre
thèse et qui nous a toujours témoigné une
grande bienveillance.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression
de notre reconnaissance et de notre profond
respect.

Monsieur le Professeur M.LAPRAS

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

Qui a bien voulu faire partie de notre
jury de thèse.

Qu'il accepte nos remerciements les plus
respectueux.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE - Intérêt de l'obtention de Poissons axéniques

- I - Intérêt économique de l'étude des Poissons
- II - Le Poisson axénique, animal de laboratoire
- III - Intérêt médical du Poisson axénique

DEUXIEME PARTIE - Conditions de l'obtention de Poissons axéniques

- I - Obtention de Poissons axéniques
- II - Elevage des Poissons axéniques

TROISIEME PARTIE - Mise au point d'une technique d'obtention de Poissons ovovivipares axéniques

- I - Introduction
- II - Obtention d'alevins axéniques par laparotomie
- III - Mise au point d'un moyen d'introduction des sujets axéniques
en isolateur de TREXLER
- IV - Essai d'une enceinte intermédiaire utilisable avant
introduction des alevins en isolateur de TREXLER

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Au cours des deux dernières décennies, la Gnotobiologie s'est imposée comme une technique exceptionnelle d'investigation. D'abord hypothèse technique, l'animal axénique s'est révélé être un modèle remarquable pour approfondir le rôle des microorganismes. De nombreuses espèces animales, ont été obtenues à l'état axénique, démontrant ainsi que la vie en l'absence de microorganismes est possible, au prix de conditions d'environnement très particulières.

Si de nombreuses espèces homéothermes ont fait l'objet d'études dans ce domaine, peu nombreux sont les travaux consacrés aux hétérothermes. Très tôt pourtant, l'intérêt de ce modèle a incité les chercheurs à le réaliser ; les premiers travaux relatifs à l'obtention de poissons axéniques sont ceux de BAKER et FERGUSON (1942) (2) avec un Cyprinodontidé ovovivipare, Xiphophorus (Platyopocilus) maculatus. SHAW et ARONSON (1954) (44) ont conservé des alevins axéniques de Tilapia macrocephala (Cichlidés) jusqu'à résorption de la vésicule vitelline. Les travaux les plus récents portent sur l'obtention à l'état axénique d'alevins vésiculés (TRUST, 1974) (51) ou non (LESEL R et LESEL Michèle, 1975) (29) de Salmonidés.

Des difficultés de tous ordres : nourriture appropriée difficile à mettre au point, pollution trop rapide des enceintes d'élevage, n'ont pas encore permis l'obtention de poissons axéniques adultes.

Néanmoins, l'intérêt que présente un tel modèle dans le domaine de la recherche justifie les efforts entrepris à l'heure actuelle pour tenter de maîtriser son élevage.

PREMIERE PARTIE

INTERET DE L'OBTENTION DE POISSONS AXENIQUES

I - INTERET ECONOMIQUE DE L'ETUDE DES POISSONS

A/ Le poisson et les ressources en protéines

Abstraction faite des possibilités d'accroître, à l'échelle mondiale, le cheptel des animaux de boucherie, il faudrait, pour pallier le déficit de production de protéines animales, développer l'exploitation des ressources de l'océan et la pratique de l'aquaculture.

Par rapport à l'élevage des mammifères et des oiseaux terrestres, celui des animaux aquatiques présente des avantages considérables :

- . les poissons, sont des hétérothermes ; ils ne dépensent pas, pour maintenir une température relativement élevée par rapport au milieu ambiant, une grande partie de l'énergie apportée par la nourriture ;
- . ils ne se constituent pas un important squelette non comestible. Les efforts fournis pour se soutenir et se déplacer sont restreints ;
- . les animaux aquatiques peuvent occuper un espace à trois dimensions (volume) et non à deux dimensions (surface) ; il en résulte que la densité de peuplement à l'hectare peut être supérieure à celle d'un élevage terrestre.

Dans ces conditions, " le milieu marin peut devenir une véritable "fabrique de protéines", si l'on assure à la chaîne alimentaire le meilleur rendement possible " (MARTRAY, 1977) (34).

BERGSTROM (1973) (4) note que la tendance actuelle est de chercher à remplacer dans l'alimentation des poissons les sources protéiques, d'origine

céréalière jusque là, par des protéines non directement utilisables pour l'Homme, comme par exemple des débris de crevettes ou des hydrolysats de plumes d'oiseaux domestiques.

Cependant, comme pour tout élevage, il ne sera possible d'atteindre de hauts rendements de production qu'avec la maîtrise de la pathologie pisciaire, une haute densité de peuplement favorisant la propagation rapide des maladies.

B/ Importance économique de l'élevage du Poisson

L'élevage du poisson représente en France une certaine activité. Fleuves, rivières, canaux, ruisseaux représentent environ 272 000 kilomètres, au long desquels plus d'un Français sur douze vient s'adonner à la pêche. La France possède par ailleurs 185 000 hectares de lacs et d'étangs. (BAUDIN, 1962) (3).

La pisciculture de repeuplement est toujours rentable d'un simple point de vue commercial, indépendamment de l'attrait touristique que peut apporter la pêche, au saumon par exemple, à une région par ailleurs assez déshéritée. (AFFRE, 1974) (1).

Le poisson de mer est lui-aussi touché par cet aspect économique : la pêche française est handicapée par le fait que les grandes ressources halieutiques ne se trouvent pas - ou ne se trouvent plus - dans nos eaux territoriales, mais beaucoup plus loin, ce qui obère les conditions d'exploitation (prix du carburant, navires puissants et donc coûteux, plusieurs jours de mer pour atteindre les bancs). Alors que, malgré la crise pétrolière, l'ensemble de la balance commerciale française se révélait équilibrée en 1975, le déficit du commerce extérieur des produits de la mer ne cesse de croître (MARTRAY, 1977) (34).

Un important programme d'aquaculture a été lancé, qui devrait permettre le passage du stade de la cueillette et de la chasse des ressources marines à celui de leur élevage. Dans ce domaine, la France peut

avoir une bonne place au niveau européen. L'aquaculture du Loup et de la Daurade est passée du stade de la recherche à celui de l'application pratique dans l'Etang de Thau ; la production en masse d'alevins devient rentable, et, avec la succession d'étangs existant sur la côte du Languedoc-Roussillon, la France peut quasiment alimenter en poissons d'élevage toute l'Europe. (LA PRAIRIE, 1977) (24).

Mais, parallèlement à l'intensification que peut connaître cet élevage, se posent des problèmes de pathologie nécessitant pour les résoudre une connaissance approfondie du Poisson. Le Poisson axénique peut être un des moyens d'investigation permettant l'amélioration de cette connaissance.

II - LE POISSON AXENIQUE, ANIMAL DE LABORATOIRE

A/ Aspect théorique

Comme cela s'est avéré chez les homéothermes, le sujet axénique, puis gnotoxénique, constitue un modèle expérimental de choix pour l'étude des mécanismes d'inter-action "hôte-environnement-populations microbiennes". De plus, le caractère hétérotherme du poisson le rend très dépendant de la température tant sur le plan de son métabolisme que sur celui de la microflore qu'il héberge. Les conditions de milieu sont reproductibles (en fixant les différents paramètres de l'eau) et variables. Il est possible de travailler sur des sujets de petite taille, permettant d'expérimenter sur des lots importants, de faire des prélèvements fréquents à l'intérieur des lots. Certaines espèces ont un temps de génération très court.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de la microflore d'espèces de poissons importantes du point de vue commercial (SHEWAN, 1949) (48), (TARR, 1954) (50). MARGOLIS (1956) (33), suivi en cela par la plupart des auteurs, admet qu' " il n'y a pas de bactéries commensales communes dans l'intestin des poissons, mais (que) la présence d'une flore bactérienne dépend seulement de l'ingestion récente de nourriture et d'eau ". Ce point

de vue n'est pas partagé par TRUST (1975) (52) qui observe qu'après 75 jours de jeûne, les Salmonidés présentent une microflore dans leur tube digestif, utilisant vraisemblablement le mucus comme substrat. POTTER et BAKER (1961) considèrent le Poisson comme un vecteur passif des microorganismes dans le milieu aquatique. (38).

LISTON (1956) (31), (1957) (32) a précisé les relations existant entre le Poisson et son milieu, montrant en particulier qu'il existait une corrélation étroite entre l'apparition saisonnière du plancton en mer du Nord et l'élévation du nombre total de bactéries du tube digestif du Carrelet Pleuronectes platessa (Pleuronectidés). LESEL et MENET (1974) (28) n'ont pas observé ce phénomène chez des espèces marines vivant en zone sub-antarctique.

Plusieurs auteurs (POTTER et BAKER, 1961 (38); SMITH, 1965 (49)) ont observé une grande pauvreté spécifique dans la flore du tube digestif des Poissons et ont noté ses rapports étroits avec la microflore de l'eau environnante. SERA et KIMATA (1972) (43) observent par contre que la majorité des souches isolées de l'eau de mer n'ont pas les mêmes caractéristiques biochimiques que celles isolées dans le tube digestif des Poissons. Leur conclusion est que la microflore du tube digestif des Poissons est limitée à un petit nombre de taxons bactériens et que l'environnement dans le tube digestif élimine la majorité des bactéries exogènes. SEKI (1969) (42) montre que le jeune Saumon digère les bactéries provenant du milieu marin. LESEL (1974) (27) étudiant la microflore digestive de la truite arc-en-ciel en élevage, observe que :

- . l'importance de la population microbienne varie très vite en fonction de l'heure du repas ;
- . des trois réservoirs digestifs étudiés (estomac, coecums, intestin), la partie coecale est la moins riche en bactéries ;
- . les microflores stomacales et intestinales sont sensiblement comparables en nombre ;
- . le nombre de bactéries est d'autant plus faible que la vacuité des réservoirs est plus grande, mais après un jeûne prolongé (42 jours), on n'observe pas de stérilité du tube digestif (10^3

à 10^5 germes par gramme de tube digestif chez des truites maintenues à 17°C) ;

Enfin l'analyse qualitative des genres bactériens a permis d'isoler des : Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio, Achromobacter, Flavobacterium, Micrococcus, Corynebacterium, Bacillus, Entérobactéries.

- . les bactéries du genre Pseudomonas sont ubiquistes et se trouvent dans le milieu extérieur comme dans le tube digestif ;
- . le genre Achromobacter ne semble pas se développer dans l'estomac et les coecums ;
- . certains genres (Acinetobacter) peuvent n'être observés que sur le poisson (peau et tube digestif) et non dans l'eau et l'aliment ;
- . les germes Gram - sont présents dans tout le tube digestif tandis que les Gram +, plus particulièrement observés sur les téguments, ont une présence plus limitée dans les différents réservoirs du tube digestif.

De nombreux auteurs ont noté le caractère épisodique de la présence d'Entérobactéries, et GUELIN (1952-1954) a (18) (19) proposé la recherche de ces Entérobactéries dans le tube digestif des Poissons comme indicateur de pollution. HUGGINS et RAST (1963) (20) aboutissent à une conclusion analogue en recherchant parallèlement les bactéries coliformes dans le tractus intestinal des Gambusies et dans leur habitat aquatique.

En conclusion, il paraît exister en permanence dans le tube digestif une microflore différente de la microflore du milieu environnant. La qualification de microflore autochtone ne pourra être donnée que lorsqu'il sera établi que cette microflore est sédentaire et apte au moment des repas à se multiplier et à constituer une microflore biologiquement active au même titre que celle ingérée avec les aliments ou l'eau.

B/ Aspect immunologique

L'absence de matériaux antigéniques majeurs durant l'existence de l'animal axénique fait de lui un excellent sujet de recherche immunologique. En effet, les animaux axéniques ont une compétence immunitaire potentiellement égale à celle des témoins conventionnels, et les effets d'un antigène expérimentalement administré ne rivalisent pas avec des réponses immunitaires concurrentes, ou ne sont pas obscurcies par celles-ci. Or, de récentes études ((GROS, 1977) (17)) montrent que le poisson peut être un sujet d'expérience en matière d'immunologie. Il a notamment été mis en évidence la possibilité d'utiliser efficacement des vaccins et des auto-vaccins dans la prévention et le traitement de certaines maladies bactériennes des Poissons (Aeromonoses).

C/ Aspect physiologique

L'étude de la nutrition et du métabolisme est un des domaines où la Gnotobiologie apporte une contribution appréciable. Elle permet notamment d'étudier les mécanismes de la digestion, de l'absorption et du métabolisme des nutriments en l'absence de micro-organismes, et les modifications qu'entraînent l'association de différents composants de la flore digestive. Ainsi, LEPKOVSKY et al. (1964) (26), travaillant sur le contenu intestinal de poulets axéniques, relèvent une modification du potentiel enzymatique du tractus intestinal en l'absence de flore : élévation des protéases (fraction trypsine) et des amylases dans les coecums, le colon, le cloaque, et diminution de l'activité lipasique.

La mise en évidence de telles différences chez le Poisson serait une preuve du rôle physiologique joué par sa flore.

III - INTERET MEDICAL DU POISSON AXENIQUE

A/ Pathogénie des maladies infectieuses

SHELBOURNE (1962) (46) améliore le pourcentage des résultats positifs de la métamorphose des poissons plats de 10 p. 100 à 70 p. 100 grâce aux antibiotiques. Il est probable que ce traitement a pour effet de limiter l'action de certains agents bactériens pathogènes pour ces poissons. Cette action peut être attribuée à un (ou plusieurs) responsable en inoculant sélectivement des sujets axéniques avec les différentes souches bactériennes isolées d'un sujet mort. SHAW et ARONSON (1954) (44) ont ainsi pu déterminer la responsabilité d'un Pseudomonas lors d'une mortalité d'oeufs embryonnés de Tilapias sur lesquels on pouvait isoler plusieurs germes pathogènes.

B/ Prophylaxie des maladies infectieuses

Les méthodes de désinfection actuelles des oeufs embryonnés trouvent confirmation de leur efficacité dans le contrôle bactériologique des produits en isolateur (LESEL R. et LESEL Michèle, 1975) (29).

Maintenant que l'on a montré l'intérêt, tout particulièrement sur le plan hygiénique, d'élever des animaux dans un environnement propre, mais non stérile, sans contact avec leurs congénères holoxéniques (DUCLUZEAU et al, 1973) (11), l'élevage de sujets exempts d'organismes pathogènes spécifiques, (spécifiés) (E.O.P.S.), avec environnement stérile, n'a plus de raison d'être. Mais même cet élevage protégé est difficilement applicable économiquement à l'heure actuelle, et tout spécialement dans les élevages dont les besoins en eau sont importants : SHEPHERD (1975) (47) signale que la production d'une tonne de truite (d'un poids d'environ 200 g) par an nécessite généralement un débit de 4,5 à 7,5 litres par seconde.

Néanmoins, la désinfection des oeufs de poissons d'élevage reste un impératif ; ces oeufs sont en effet très souvent les vecteurs des agents

de la plupart des maladies contagieuses, assurant le passage de l'adulte reproducteur, porteur sain de germes, aux alevins et ceci en dehors de toute contamination de l'eau.

Cette désinfection peut éviter la transmission, par l'oeuf, de nombreuses maladies :

- . chez la truite : septicémie hémorragique virale, nécrose hémato-poïétique infectieuse, furunculose et autres aéromonoses, costioses, corynebactérioses (GERARD, 1973) (14), (de KINKELIN, 1974) (23), GERARD et de KINKELIN, 1973) (15) ;
- . chez le brochet : "maladie rouge à rhabdovirus" du brocheton, myxobactérioses, saprolégnirose, ichtyophthyriose (DERANGERE, 1975) (9).

Cette liste importante montre l'intérêt d'un traitement. Néanmoins celui-ci s'avère inefficace pour les maladies à transmission verticale transovarienne de parasites intra-cellulaires, notamment dans le cas de la nécrose pancréatique infectieuse des Salmonidés (DORSON et de KINKELIN, 1974) (10) et de la microsporidiose des Salmonidés (PORTE et CHILMONCZYK, 1974) (37).

Mais, dans le contexte économique actuel, il est inconcevable de maintenir jusqu'à un stade de développement plus avancé ces oeufs embryonnés dans un environnement axénique ou même protégé lorsqu'ils sont destinés à l'élevage. Néanmoins, les conditions économiques pouvant évoluer, certaines techniques d'élevage, en circuit fermé par exemple, pourraient être rentablement utilisées, justifiant éventuellement un statut sanitaire particulier.

DEUXIEME PARTIE

CONDITIONS DE L'OBTENTION
DE POISSONS AXENIQUES

I - OBTENTION DE POISSONS AXENIQUES

Le choix de l'espèce d'intervention doit se faire en fonction de divers critères :

- . l'usage auquel sont destinés les sujets axéniques ;
- . leur disponibilité tout au long de l'année ;
- . leur facilité d'obtention ;
- . leur facilité d'élevage ;
- . éventuellement leur facilité de reproduction.

A/ Historique

BAKER & FERGUSON (1942) (2) ont prélevé des embryons de Xiphophorus (Platypoecilus) maculatus (Cyprinodontidés ovo-vivipares) par laparotomie de femelle gravide à peu de jours du terme. Suivant la technique préconisée, la femelle est totalement immergée dans l'alcool pendant 3 mn, puis dans la teinture d'iode pendant 7 mn, puis rincée à l'alcool et enfin à l'éther, qui, par évaporation, permet d'obtenir une surface sèche et stérile. Après fixation de la femelle sur une planchette de balsa stérile, les écailles du champ opératoire sont retirées à la pince ; une incision légèrement postéro-dorsale par rapport à l'anus permet l'introduction d'une pipette stérile dans la cavité abdominale ; une légère aspiration entraîne la rupture de la paroi ovarienne et permet de recueillir les embryons dans la pipette.

SHAW et ARONSON (1954) (44) ont obtenu des alevins axéniques de Tilapia macrocephala (Cichlidés) en incubant stérilement des oeufs embryonnés préalablement baignés dans une solution de formaldéhyde à 0,04 p. 100 pendant 10 minutes.

TRUST (1974) (51) féconde artificiellement en conditions aseptiques des ovules de divers salmonidés (Oncorhynchus hisutch, O. keta, O. nerka, Salmo aquabonito, S. gairdneri, Salvelinus fontinalis). Les produits sexuels sont prélevés par laparatomie aseptique. La surface ventrale des reproducteurs est désinfectée à la polyvinyl pirolidone iodée (PVP.I).

LESEL R. et LESEL Michèle (1975) (29) réalisent la désinfection des oeufs embryonnés de trois Salmonidés (Salmo gairdneri, S. trutta, S. salar) par lot de 100 environ à l'aide d'un bain à la PVP.I en solution à 4 p. 1000 pendant 20 mn à 10°C.

B/ Analyse critique des méthodes employées

1. Méthodes concernant les ovipares

Les bains de formaldéhyde à 0,04 p. 100 pendant 10 mn sont d'une efficacité aléatoire : 8 lots stériles sur 35 lots traités (SHAW et ARRONSON, 1954) (44).

Les bains de PVP.I, préconisés par Mc FADDEN (1969) (12) et utilisés par LESEL R. et LESEL Michèle (1975) (29), ne sont pas toxiques pour les oeufs, et s'avèrent actifs contre les virus et les bactéries. Par contre, il sont très toxiques pour les poissons, et les oeufs désinfectés doivent être rincés au moins trois fois à l'eau stérile pour en éliminer toute trace. GERARD (1973) (14) a constaté que les spores de champignons sont résistantes aux iodophores.

WOLF et al (1963) (54) signalent que la plupart des survivants d'une épizootie de NPI peuvent rester porteurs du virus jusqu'à leur maturité sexuelle et le disséminent dans leurs produits sexuels, entraînant ainsi la transmission verticale de la maladie. Il en est de même de la Microsporidiose (PORTE et CHILMONCZYK, 1974) (37). Il importe donc de choisir des géniteurs sains provenant d'une pisciculture saine.

2. Méthodes concernant les ovo-vivipares

En principe la cavité péritonéale des poissons sains est stérile (BAKER et FERGUSON, 1942) (2) mais néanmoins, deux sources de contamination sont possibles en cas d'erreur de manipulation ou de topographie abdominale aberrante du sujet :

- . l'intestin, se situe en position antéro-ventrale au début de l'opération, et peut donc être assez facilement évité, surtout chez les gros sujets ; il recule progressivement au fur et à mesure de l'aspiration des embryons et peut finalement être aspiré à son tour entraînant la contamination de la zone d'intervention ;
- . le rein est, chez le poisson, à la fois un organe excréteur et un organe lymphoïde. Il est, de ce fait, très irrigué et les bactéries véhiculées par le sang sont souvent arrêtées à son niveau, notamment les Pseudomonas qui s'introduisent au niveau des branchies et que l'on retrouve presque toujours. (LASSERRE et MEURILLON, 1976) (25). La pipette peut parfois léser le rein sur des sujets de petite taille.

C/ Intérêt des Cyprinodontidés ovovivipares

Les cyprinodontidés ovovivipares sont des poissons que l'on se procure toute l'année chez les fournisseurs spécialisés, très faciles à élever en laboratoire, très prolifiques (20 à 70 jeunes en moyenne tous les 30 - 40 jours), peu voraces, donc peu polluants (caractère très important en l'absence de toute bactérie), et de taille relativement réduite. Les alevins, bien que de petite taille, naissent entièrement développés. Le "Guppy" (Poecilia reticulata) (Lebistes), originaire de la Trinidad, de la Guyane et du Vénézuéla, est la plus petite (mâle 2,8 cm, femelle 5,5 cm environ) des espèces courantes de cette famille, et la plus précoce : la maturité sexuelle est atteinte en 2 à 4 mois (YAMANOTO, 1975) (55). Sa grande variabilité phénotypique en a fait une espèce de choix pour les études génétiques.

Le "Black lyre" (Poecilia (Mollienesia) formosa) atteint 8 cm, de même que le "Sphenops" (Poecilia (Mollienesia) sphenops) et sa variété noire ou "Black Molly". Le "Velifera" (Poecilia (Mollienesia) velifera) peut mesurer jusqu'à 15 cm. Ces dernières espèces sont plutôt phytophages, et sont moins précoces que le Guppy.

Le "Xipho" ou "Porte-épée" (Xiphophorus helleri) atteint 12 cm et est très prolifique (jusqu'à 200 alevins).

Le "Platy" (Xyphophorus (Platypoecilus) maculatus) est précoce (maturité sexuelle à huit semaines) mais ses alevins sont plus petits et plus fragiles que ceux du Xipho (GILBERT et LEGGE, 1972) (16).

Les Gambusies (Gambusia affinis Halbrooki) ont été acclimatées dans certains étangs du Sud de la France, où on les rencontre à l'état sauvage. Du fait de l'absence de sélection artificielle, il est probable que cette espèce est plus rustique que les précédentes.

Les alevins appartenant aux espèces ovo-vivipares sont très sensibles aux variations brusques de température. Il est donc important de placer les alevins prélevés dans un environnement dont la température est très voisine de celle du bac de la mère.

Il est parfois assez difficile d'estimer le stade de gestation de la femelle achetée peu avant l'opération. En effet, sa morphologie externe à un stade donné varie avec le nombre d'alevins portés. On observe assez souvent des femelles présentant un abdomen distendu par des ovules non fécondés et donc impropres à l'usage auquel on les destine. Ce fait souligne l'intérêt d'avoir au laboratoire un élevage contrôlé assurant une disponibilité permanente en sujets à terme.

II- ELEVAGE DES POISSONS AXENIQUES

A/ Technologie de l'élevage en isolateur

On utilise un isolateur de type TREXLER (SAINT-MARTIN et al;1975)(40) muni d'un sas classique et d'un sas liquide rempli d'un mélange de Bétadine (iodophore) et de détergent.(Voir fig.1 et 2)

Cet isolateur comprend deux alimentations d'air stérile différentes.La première alimentation assure une fourniture d'air stérile sous faible pression et est destinée à maintenir l'isolateur en légère sur-pression.La deuxième alimentation permet l'aération de l'eau de l'aquarium et la circulation de l'eau dans le système de filtration.Le chauffage de l'enceinte est réalisé soit par un groupe résistance-thermostat électrique,soit par climatisation de la salle d'expériences.

Cet isolateur est stérilisé par pulvérisation d'acide péracétique à 10%

B/ Problèmes posés par l'élevage en isolateur

1. Qualité de l'eau

Il est nécessaire d'introduire et d'évacuer des quantités d'eau bien supérieures à celles manipulées dans le cadre de l'élevage de petits mammifères. La seule solution économique dans l'immédiat consiste à introduire des récipients d'eau stérilisée par le sas de l'isolateur ; mais à partir d'une certaine quantité, le travail devient fastidieux et on multiplie d'autant les risques de contamination. La solution idéale serait d'obtenir une alimentation continue en eau stérile (LESEL, communication personnelle).

Pour l'évacuation de l'eau usée, il est néanmoins possible d'utiliser un système voisin de celui qu'utilisent SAINT-MARTIN et al. (1975) (40) (41) pour les perfusions de malades en isolateurs : un siphon stérile est sorti de l'isolateur par un sas liquide (Bétadine + détergent).

une cellophane
marrant le caisson

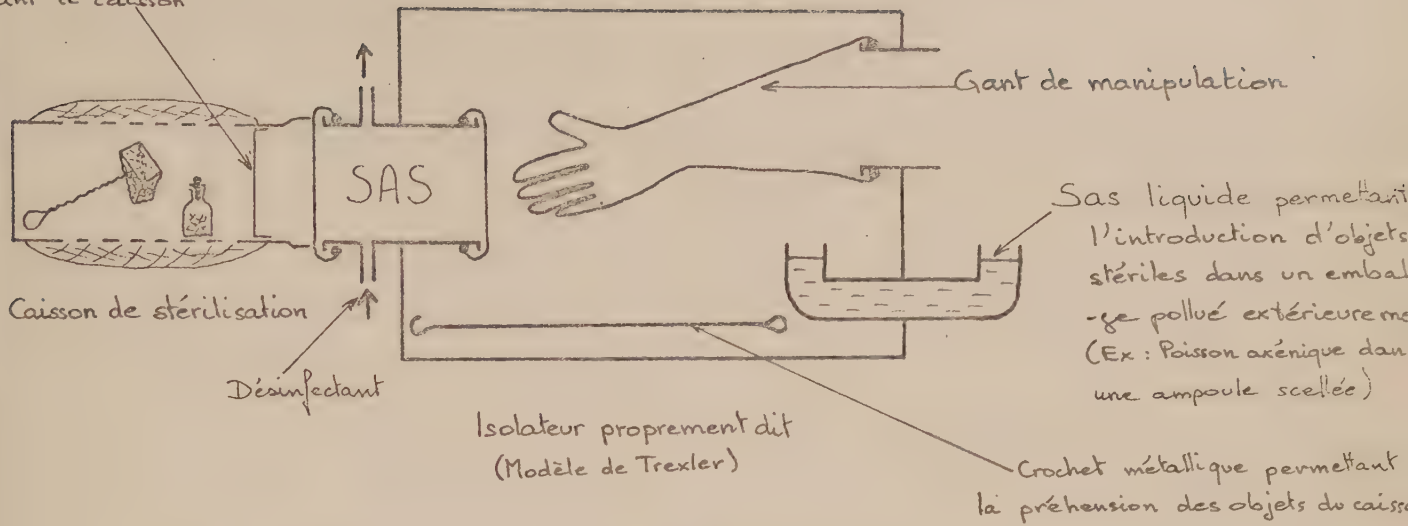


Fig.1 Enceinte stérile pour la reproduction en axénie

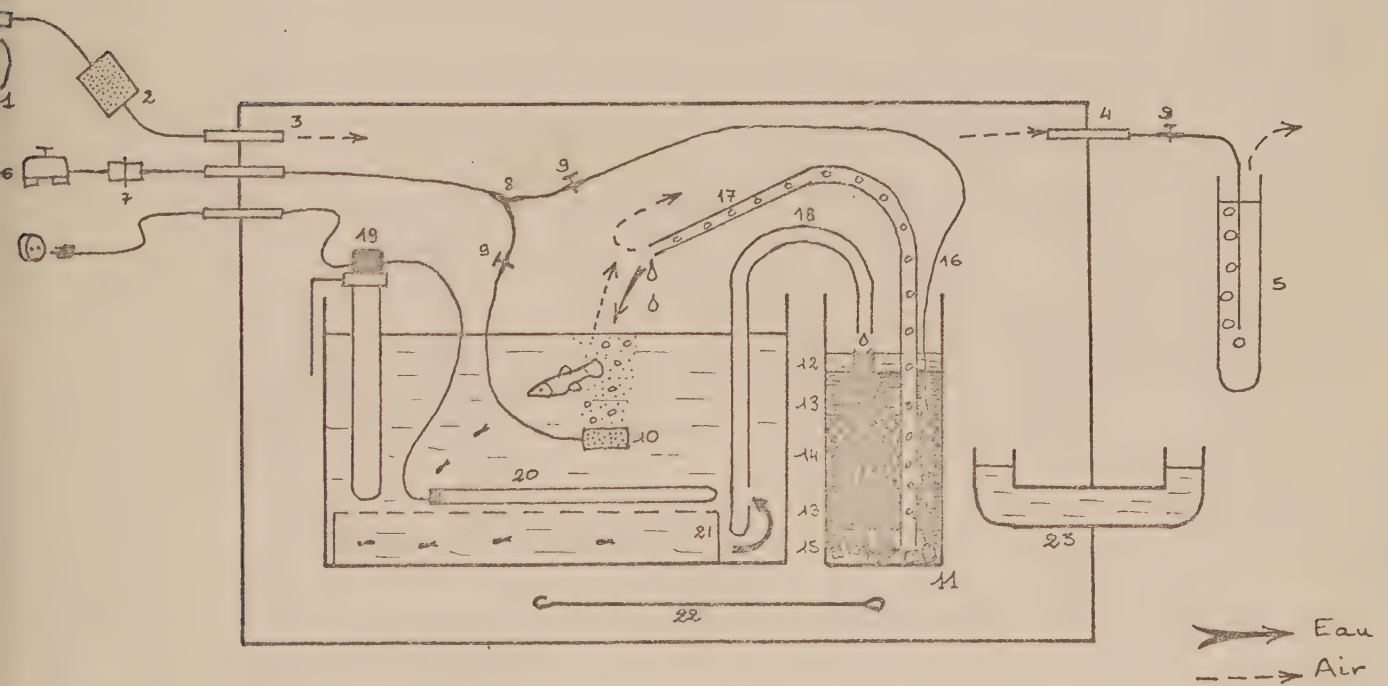


Fig.2 Aménagement intérieur de l'isolateur de Trexler

me de mise en surpression d'air: 1: Ventilateur. 2: Cartouche filtrante. 3: Entrée de l'air stérile
e de l'air provenant de 1 et 6. 5: Barbotage de l'air usé dans une solution antiseptique.
ème de ventilation-filtration: 6: Pompe à air Type Belbul ou Rena. 7: Filtre à air SWINNEX Q25,
ord plastique en Y. 9: Robinets de réglage. 10: Diffuseur d'air. 11: Cuve de filtration contenant:
u souillée en cours de décantation. 13: Laine de verre. 14: Charbon activé. 15: Gravier. 16: Arrivée
sous pression. 17: Exhausteur. 18: Siphon-potence
ème de chauffage: 19: Thermostat à bilame. 20: Résistance électrique étanche
ssaires divers: 21: Grillage de protection des nouveau-nés. 22: Crochet métallique. 23: Sas liquide

DISPOSITIF DE REPRODUCTION

2. Toxicité des produits de dégradation de l'acide péracétique

Une demi-heure environ après sa pulvérisation, ou l'acide péracétique s'est dégradé en acide acétique dont la présence dans l'isolateur peut poser divers problèmes :

- . les alevins vésiculés y sont très sensibles; la résorption de la vésicule intervient normalement, mais l'épithélium extérieur du sac vitellin apparaît durci et ne suit plus la diminution de volume de la vésicule (LESEL R. et LESEL Michèle, 1975) (29).;
- . les traces résiduelles d'acide acétique peuvent abaisser le pH de l'eau de l'aquarium ; cette variation est d'autant plus sensible que l'eau stérilisée par autoclavage a perdu son pouvoir tampon (précipitation des carbonates) ;
- . La DL 50 de l'acide acétique n'est pas négligeable : 75 ppm (KEMP et al., 1973) (22).

Il est donc nécessaire de procéder à un rinçage soigneux du matériel d'élevage, fait qui rend plus aigu encore le besoin d'une eau stérile disponible en abondance.

3. Produits d'excrétion

DELAUNAY (1929)⁽⁸⁾ a observé chez la Carpe que, par rapport à l'azote total éliminé, l'azote ammoniacal représente 55 à 80 p. 100 et l'azote uréique de 6 à 14 p. 100, excrétés tous deux à 90 p. 100 au niveau des branchies. En accord avec les observations de PORA et PRECUP (1958) (36) , VELLAS et SERFATY (1974) (53) ont remarqué que l'excrétion ammoniacale est en relation avec le volume d'eau qui est mis à la disposition des branchies et que l'accumulation d'azote dans l'eau entraîne une diminution de l'élimination branchiale et une augmentation des teneurs en azote du sang.

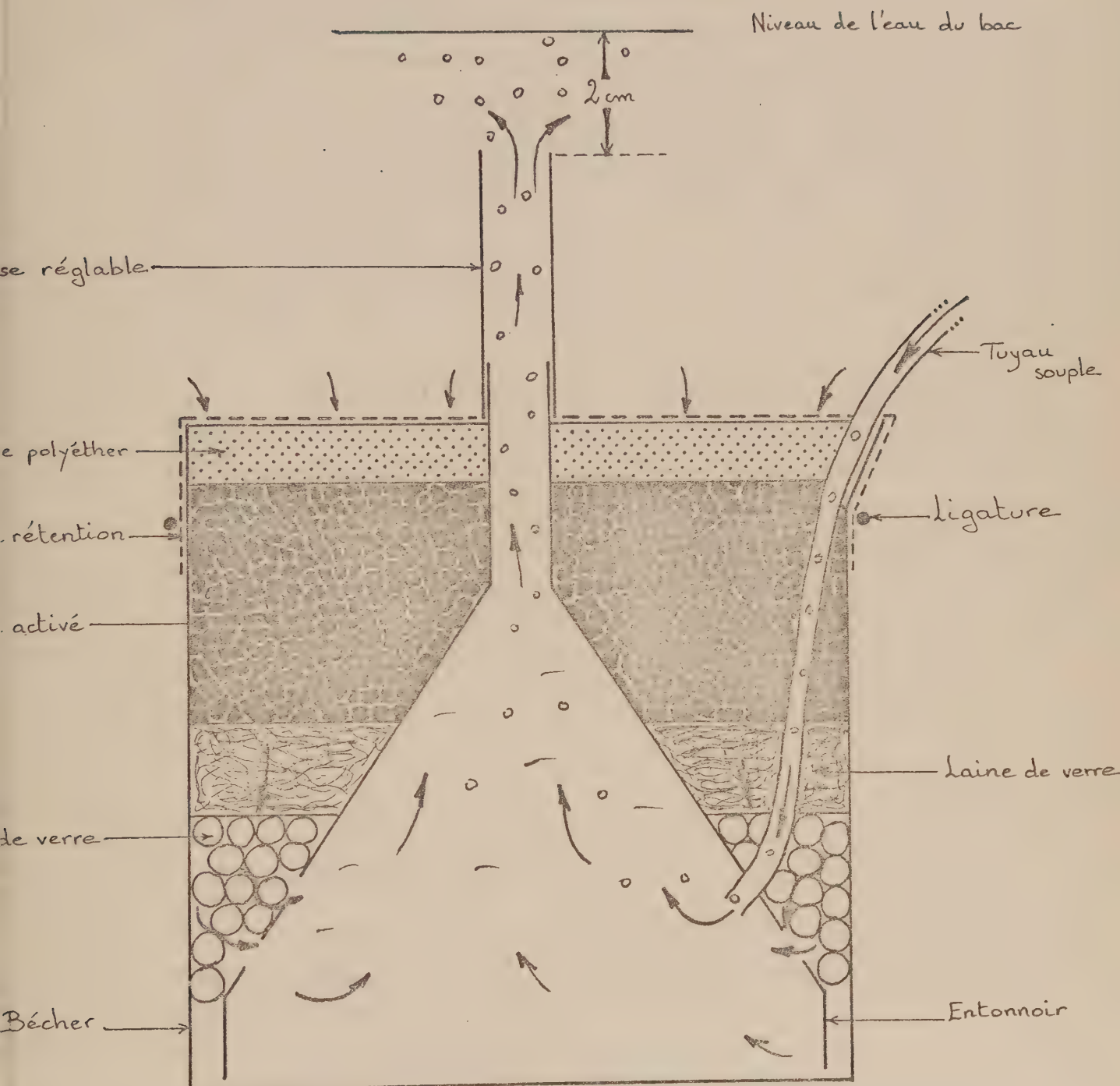


Fig. 3 - Appareil stérilisable pour l'épuration
des eaux en aquarium

Les substances ammoniacales excrétées se présentent habituellement sous deux formes : l'ammoniac moléculaire (NH_3) et l'ammoniaque ionisée (NH_4^+) (SHEPHERD, 1975) (47). L'ammoniaque moléculaire est la plus toxique des deux formes, et sa toxicité aiguë varie avec le pH de l'eau : la DL 50 est de 1 ppm à pH 12, de 1,5 ppm à pH 10, de 33,3 ppm à pH 8 et de 100,0 à pH 7,5 (CARBIENER, 1967) (7). Sa toxicité chronique se manifeste par une hyperplasie extensive de l'épithélium branchial et un retard de croissance marqué (BURROWS, 1964) (5). Il se produit une accumulation d'autant plus importante de substances ammoniacales dans l'eau de l'isolateur que la dégradation bactérienne n'intervient pas pour les transformer en nitrates nettement moins toxiques.

Dans la mesure où un système d'alimentation continue en eau stérile n'est pas encore mis au point, et que les changements d'eau fréquents constituent une source importante de contamination de l'isolateur, il semblerait qu'une filtration sur charbon végétal activé, qui peut réduire sensiblement le taux d'ammoniac non ionisé soit la seule solution pratique à ce problème (SHAW et ARONSON, 1954) (44). (Fig.3)

C/ Nutrition

1. Stérilisation des aliments

SACQUET (1968) (39) préconise la chaleur humide (120°C pendant 30 mn), l'irradiation γ et la stérilisation chimique à base d'oxyde de propylène ou d'éthylène notamment.

JEAN-BLAIN (1974 et communication personnelle) (21) ajoute à ces méthodes une stérilisation ménagée pour les aliments peu contaminés et la tyndalisation (1/2 h à 70°C trois jours de suite).

En fait, les expérimentations préliminaires effectuées dans le cadre de ces travaux ont montré qu'un autoclavage classique (120°C pendant 20 mn au moins) est la seule méthode thermique de stérilisation apportant une sécurité absolue. (Voir tableau 1) L'échec des autres méthodes thermiques a toujours été dû à la présence d'un grand bacille Gram + sporulé, vraisemblablement un Bacillus, résistant souvent spontanément aux hautes températures, et très difficile à détruire lorsqu'il est sporulé.

2. Valeur nutritive après stérilisation

Deux catégories de nutriments sont susceptibles d'être des facteurs limitants: les vitamines et les acides aminés. De nombreuses vitamines sont indispensables aux Poissons : Thiamine, Riboflavine, Biotine, Acide pantothénique, Choline, Acide folique, Cyanocobalamine-B 12, inositol, pyridoxine (BAUDIN, 1962) (3). Or certaines d'entre elles sont thermolabiles. Néanmoins, il en reste fréquemment un pourcentage non négligeable après autoclavage. (JEAN-BLAIN communication personnelle) ; ceci est confirmé par les essais effectués par SHAW (1957) (45) qui ne constate pas de retard de croissance chez des Tilapias conventionnels nourris avec de la nourriture sèche du commerce autoclavée.

Par contre, BAKER et FERGUSON (1942) (2) augmentent très nettement la durée de survie des Platys axéniques en introduisant des nématodes axéniques vivants et des algues autoclavées dans leur régime alimentaire.

Il existe dans le commerce des préparations pharmaceutiques à base d'acides aminés, d'hydrolysats de Saccharomyces cerevisiae et de vitamines qui sembleraient aptes à couvrir au moins une part des besoins signalés par BAUDIN. Le conditionnement en ampoules de verre scellées offre l'avantage d'une stérilisation avec l'acide péracétique à 10 p. 100 avant introduction dans l'isolateur.

Température de stérilisation	Fréquence	Durée	Température d'incubation	Contrôle bactériologique	
				Aérobie	Anaérobie
60°C	1-2-3	30 mn	37°C	+	/
60°C	1-2-3	30 mn	21°C	+	/
70°C	1-2-3	30 mn	37°C	+	/
70°C	1-2-3	30 mn	21°C	+	/
70°C	1-3-5	30 mn	37°C	+	/
70°C	1-3-5	30 mn	21°C	+	/
105°C	1	20 mn	37°C	+	/
105°C	1	20 mn	21°C	+	/
105°C	1	30 mn	37°C	+	/
105°C	1	30 mn	21°C	+	/
120°C	1	20 mn	37°C	-	-
120°C	1	20 mn	21°C	-	-
120°C	1	30 mn	37°C	-	-
120°C	1	30 mn	21°C	-	-

TABLEAU I - Résultats de la tyndallisation (1a - 3b)
et de la stérilisation conventionnelle
à l'autoclave (4a - 7b)

Fréquence : les chiffres désignent les jours
d'intervention : 1/2/3 = 1er jour, 2ème jour,
3ème jour.

La nourriture traitée en vue de sa stérilisation est une préparation commerciale équilibrée, à base de mollusques, de farine de poisson et d'algues, lyophilisée, et destinée à l'élevage des poissons tropicaux d'eau douce en aquarium. Elle est commercialisée sous le nom de TetraMin.

Entre temps, les différents échantillons sont, soit mis à l'étuve à 37°C, soit laissés à la température de la pièce (21°C). Trois jours après la fin du traitement, des contrôles bactériologiques ont été effectués sur Gélose au sang et Gélose T à 21°C et à 37°C en aérobiose et en anaérobiose. Le dénombrement est effectué 8 jours après.

3. Nourriture vivante

Les Artemia salina sont des crustacés phyllopo- des de l'ordre des Anostracés à oeufs particulièrement résistants, dont les larves sont couramment utilisées comme nourriture vivante d'appoint en aquariophilie. Il était donc particulièrement intéressant de les obtenir à l'état axénique.

a. Matériel et méthodes

Le système d'élevage, analogue à celui présenté sur la figure 6, est stérilisé en deux parties : d'une part le flacon rempli de 500 ml d'une solution de NaCl à 10 p. 1000, d'autre part le bouchon équipé du dispositif d'aération. Autoclavage 120°C - 30 mn.

Les oeufs d'Artemia sont décantés dans une solution de NaCl à 25 p. 1000. Les oeufs morts, moins denses, flottent en surface et sont éliminés.

Deux méthodes ont été utilisées pour désinfecter les oeufs vivants :

(alcool - éther 3 mn	(Ether 99 secondes
(Bétadine (PVP-I) 5 mn	(Chloramine T
(Ether rinçage	((Hydroclonazone N.D.)
(	(5 comprimés 10/ml 5mn

Chacun des lots est ensuite introduit après trois rinçages dans une solution NaCl 10 p. 1000 stérile dans un flacon d'élevage.

Les contrôles bactériologiques sont effectués après éclosion sur Gélose au sang et Gélose T, à 21°C et à 37°C, en aérobiose.

b. Résultats

Trois jours après la mise en flacon, les oeufs éclosent en donnant des larves Nauplius. Les contrôles bactériologiques ne permettent pas de mettre en évidence une éventuelle contamination bactérienne. On constate un pourcentage d'éclosion meilleur avec la Chloramine T, mais la survie des larves est de courte durée, le rinçage ne pouvant sans doute éliminer toute trace de désinfectant; or celui-ci est particulièrement nocif pour les crustacés inférieurs (DL 50 : 0,001 ppm). La désinfection à l'alcool-éther et bétadine se révèle donc être préférable.

D/ Contrôles bactériologiques des enceintes stériles

FULLER (1968) (13) préconise l'utilisation conjointe des méthodes de culture et de l'examen microscopique, à raison d'un contrôle par semaine.

Les examens microscopiques sont ceux couramment pratiqués en microbiologie.

Les milieux de culture utilisés doivent être aussi peu sélectifs que possible.

BUTTIAUX (1966) (6) observe que l'utilisation de Gélose T et de Gélose au sang de mouton permet l'isolement de la presque totalité des germes. La Gélose T permet, en particulier, la détection de certains Pseudomonas dont le développement est inhibé par le sang de mouton.

LESEL R. et LESEL Michèle (1975) (29) ont utilisé le milieu suivant :

Proteose peptone DIFCO	10 g
Tryptone DIFCO	5 g
Poudre de viande MERCK	10 g
Glucose	5 g
Gélose	10 g
Eau déminéralisée	1000 ml

pH ajusté à 7,6 avant autoclavage (FOURNAUD et MORAND-FEHR, 1965) (56)

Ce milieu s'est avéré donner des informations plus complètes que les milieux de contrôle conventionnels.

LESEL Michèle (1976) (30) a effectué une étude exhaustive des techniques culturales de la microflore digestive des Salmonidés qui l'a conduite à mettre au point un milieu qui s'est révélé être plus performant que les précédents du fait de sa meilleure adaptation aux exigences des bactéries du tube digestif des truites élevées en piscicultures.

TVG 1 P	Extrait de viande	5 g
	Protéose peptone	5 g
	Tryptone	2,5 g
	Glucose	1 g
	Pourpre de Bromocrésol	0,02 g
	Gélose	10 g
	Eau déminéralisée qsp.....	1000 ml

pH 7,6 avant autoclavage

Les ensemencements sont réalisés en aérobiose : boîtes de Pétri et en anaérobiose : tubes Raibaud. L'incubation a lieu à 22°C et à 37°C. Les boîtes et les tubes sont dénombrés huit jours après. En effet, de nombreux germes ne présentent des colonies visibles et aisément dénombrables qu'au bout de ce laps de temps.

E/ Reproduction

L'idéal pour une utilisation pratique du poisson axénique en laboratoire serait d'obtenir la reproduction en isolateur et le maintien en conditions axéniques d'un élevage sain. Néanmoins, indépendamment de la difficulté qui consiste à élever convenablement le poisson axénique jusqu'à l'âge adulte, il est relativement malaisé de récréer en isolateur un environnement favorable à la reproduction.

PLEASANTS (1968) (35) n'écarter pas l'hypothèse selon laquelle les taux de fertilité plus bas observés à l'état axénique chez certaines espèces seraient dus en grande partie à des conditions de logement et d'éclairage défavorables.

Néanmoins, les Cyprinodontidés, relativement peu exigeants constituent un matériel de choix pour d'éventuelles expérimentations.

TROISIEME PARTIE

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'OBTENTION

DE POISSONS OVOVIVIPARES AXENIQUES

I - INTRODUCTION

Les travaux concernant l'obtention de poissons axéniques se sont divisés en deux groupes d'expérimentations:

- * la reprise de la technique d'obtention de poissons axéniques de BAKER et FERGUSON (1942)(2)
- * la mise au point d'une technique d'introduction des alevins axéniques en isolateur, avec conservation de ceux-ci en enceinte intermédiaire le temps d'un contrôle bactériologique.

II - OBTENTION D'ALEVINS AXENIQUES PAR LAPAROTOMIE

La technique utilisée est celle décrite par BAKER et FERGUSON (1942) (2). Directement extrapolée de celle utilisée pour l'obtention de mammifères axéniques, elle consiste à prélever les embryons vivants proches de l'expulsion par laparotomie abdominale de la femelle. La technique d'intervention de BAKER et FERGUSON paraît satisfaisante a priori. Cependant, diverses tentatives d'obtention d'alevins vivants ont échoué (LESEL, communication personnelle). Il paraissait donc intéressant de reprendre cette technique en analysant les facteurs susceptibles de jouer un rôle : technique opératoire, survie en bac transfert, alimentation.

A/ Matériel et Méthodes - Espèces d'intervention

Les sujets utilisés sont des Guppys (Poecilia (Lebistes) reticulata). Les femelles gravides se reconnaissent à leur embonpoint et à la taille de leur tache embryonnaire (fig. 4).

Les femelles paraissant presque à terme sont mises à jeun une journée puis sont assommées et désinfectées, selon la technique de BAKER et FERGUSON modifiée sur deux points : la femelle est écaillée avant désinfection, la teinture d'iode est remplacée par la PVPI (Bétadine).

Alcool-éther = 3 minutes

Bétadine = 7 minutes

Ether Rincage

La femelle désinfectée est ensuite fixée stérilement sur une planchette de polystyrène expansé recouverte d'une feuille d'aluminium préalablement flambée à l'alcool. Une incision dans la paroi latérale est effectuée en position dorsale et légèrement postérieure par rapport à l'an us et une pipette stérile montée sur une petite poire est introduite dans la cavité péritonéale, en contact avec la paroi ovarienne (fig. 5). Celle-ci se rompt sous l'effet de l'aspiration, et les alevins sont entraînés dans la pipette. Ils sont provisoirement placés dans un tube à essai contenant de l'eau du robinet stérile et aérée préalablement. Puis, ils sont introduits aseptiquement dans l'incubateur stérile (fig. 6) dont l'aération et le bain-marie fonctionnent déjà depuis au moins 24 heures. Cet incubateur est constitué par un flacon à large goulot d'1 litre (type flacon à transfusion) muni d'un bouchon en caoutchouc portant les tuyaux d'entrée et de sortie de l'air et un cathéter. L'air introduit est stérilisé par filtration sur membrane Millipore 0,25 μ . L'air usé est évacué en barbotant dans une solution antiseptique (eau de javel). Le milieu est maintenu à 25°C par un bain-marie.

Les contrôles bactériologiques sont effectués deux fois par semaine. Le prélèvement d'eau se fait grâce au cathéter en matière plastique et on ensemence des boîtes de Pétri avec Gélose au sang de mouton et Gélose T à 22°C et 37°C, en aérobiose et anaérobiose.

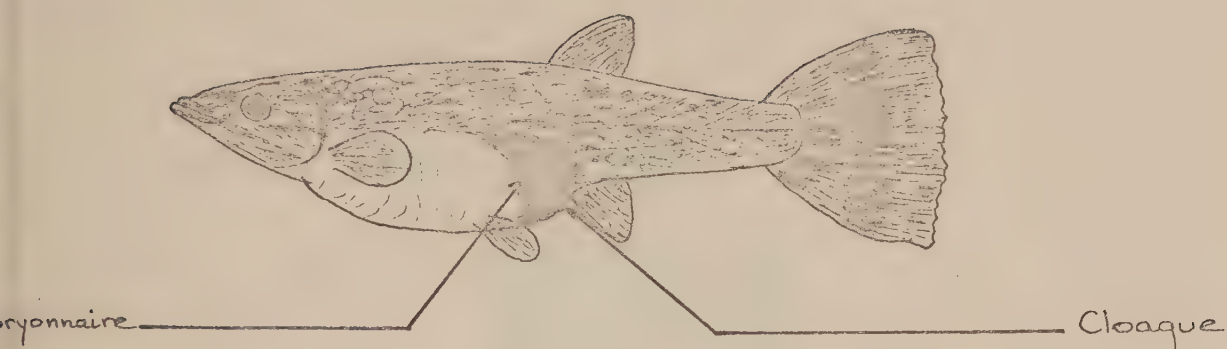


Fig. 4 - Anatomie externe de la femelle gravide

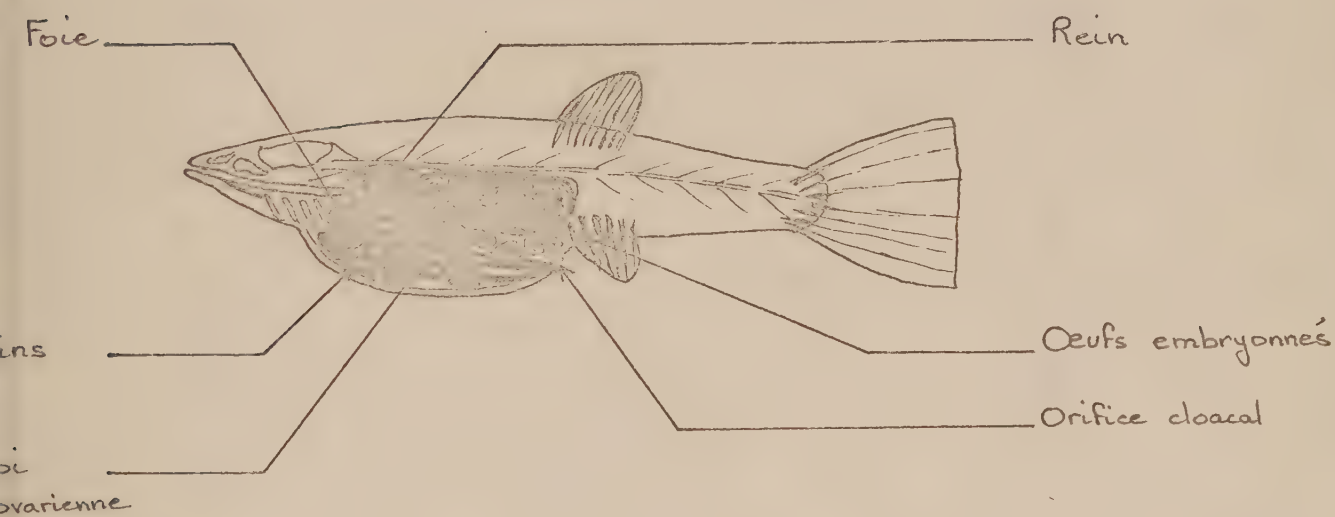


Fig. 5 - Coupe sagittale schématique de la femelle gravide

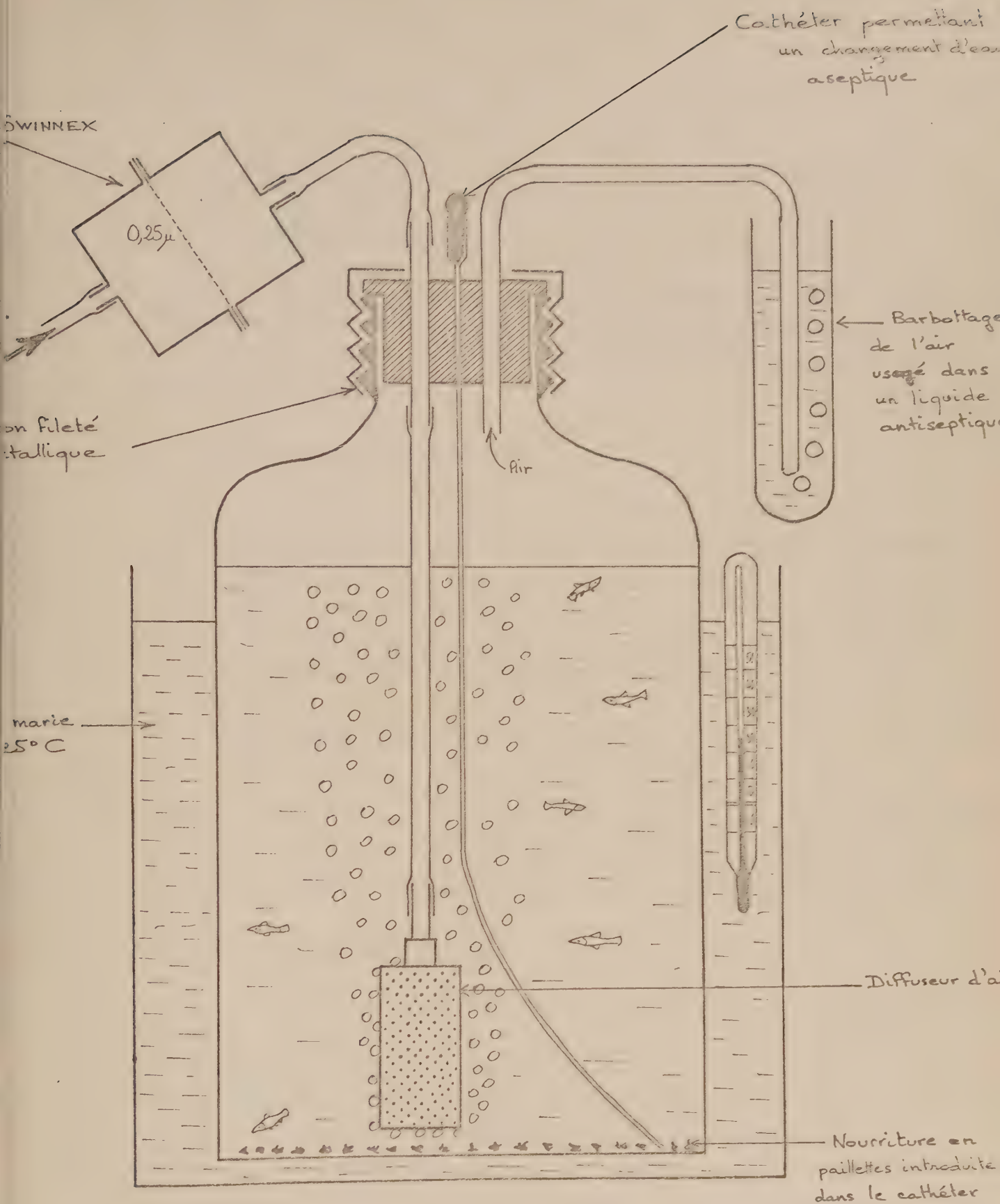


Fig. 6 . Flacon d'élevage des Alevins axéniques

B/ Résultats

1. Première intervention

La femelle, obtenue peu de jours auparavant, présente un net embonpoint et une tache embryonnaire marquée. Le prélèvement aseptique dans le sac ovarien ne donne que des oeufs non fécondés sur le point d'être rejetés à l'extérieur.

2. Seconde intervention

La femelle, de petite taille, présente un embonpoint et une tache embryonnaire assez peu nets, mais son comportement laisse supposer que le terme est proche. L'intervention permet d'obtenir 6 alevins, mais du fait de ce très petit nombre d'embryons, le sac ovarien est tout de suite vidé et une anse intestinale aspirée. Devant le risque évident de contamination, la manipulation n'a pas été poursuivie.

3. Troisième intervention

Femelle de petite taille, mais à l'abdomen très distendu, on obtient à la ponction un mélange d'oeufs embryonnés et d'alevins vésiculés, tous morts quelques heures après. Les contrôles bactériologiques ont révélé la présence d'un Pseudomonas, vraisemblablement d'origine rénale.

4. Quatrième intervention

30 alevins ont été prélevés, et 21 sont restés vivants pendant 29 jours. Ils sont . . . morts tous ensemble et brutalement pendant la nuit, sans qu'aucun signe antérieur d'altération de leur état ait pu le laisser prévoir. Ils avaient alors la même taille que les témoins conventionnels conservés dans des conditions sensiblement équivalentes et recevant la même alimentation. Tous les contrôles bactériologiques sont restés négatifs pendant 40 jours (du début jusqu'à 11 jours après la mort).

5. Cinquième intervention

La femelle, bien que son abdomen soit fortement distendu, présentait une tache embryonnaire relativement peu importante. A l'ouverture on n'a observé que des oeufs embryonnés à un stade très peu avancé, dont aucun n'est parvenu jusqu'à l'éclosion ; les contrôles bactériologiques n'ont pu déceler de contamination bactérienne. La dissection de la femelle après prélèvement des alevins a mis en évidence dans la partie antérieure de la cavité abdominale une larve pléroceroïde de Diphyllbothridé (Cestodes). Le parasite volumineux, occupait à peu près le tiers de la cavité.

C/ Discussion et conclusions

La mort soudaine de l'ensemble des alevins de la quatrième intervention ne peut être expliquée que par des hypothèses :

- . panne de courant nocturne arrêtant le système d'aération ; cette hypothèse paraît insuffisante pour expliquer à elle seule cette mortalité, les témoins n'ayant pas été affectés ;
- . accumulation de matières organiques (NH_3 notamment) trop importante aboutissant à une véritable pollution du milieu. Si cette cause avait agi seule, les poissons seraient morts de façon plus étalée dans le temps, après une altération marquée de leur état général.

En fait, il semble probable que ces deux causes ont agi conjointement : les alevins axéniques ont subi une attaque permanente de leurs branchies par l'ammoniaque existant en quantité insuffisante pour être toxique de façon aiguë, mais provoquant néanmoins une insuffisance respiratoire chronique par hyperplasie extensive de l'épithélium branchial. Cette insuffisance était compensée en temps normal par une concentration suffisante en oxygène dissous dans le milieu, mais une panne d'électricité a vraisemblablement abaissé ce taux d'oxygène suffisamment longtemps pour provoquer la mort de ces alevins. Les témoins conventionnels ont bien supporté cette panne du fait de la très faible concentration en ammoniaque

dans leur milieu, les bactéries de la nitrification transformant ce corps en nitrates pratiquement pas toxiques.

Le diagnostic de gestation "au coup d'oeil", suffisant en aquariologie classique, s'avère trop imprécis pour l'expérimentation entreprise ; il serait bon de faire reproduire les femelles une fois spontanément et de les classer ensuite en fonction de la date présumée de l'accouchement suivant. Le cycle durant environ un mois à 26°C, une répartition des femelles en plusieurs lots (comprenant chacun les femelles ayant accouché pendant 3 jours consécutifs) permettrait d'intervenir sur des femelles entre 2 et 5 jours avant le terme ; ainsi pourrait-on disposer d'un excellent moyen d'obtention d'alevins vigoureux tout en limitant les pertes dues à l'immaturité.

Cette série d'expérimentations souligne l'importance :

- . d'éviter les pannes de courant prolongées (branchement automatique sur un groupe électrogène en cas de défaillance du secteur) ;
- . de changer l'eau des alevins plus facilement que dans le système de flacons ;
- . de filtrer l'eau sur charbon actif afin d'adsorber les polluants
- . d'effectuer des contrôles réguliers au niveau de la pollution organique (NH_3 notamment) afin de détecter à temps un éventuel seuil toxique.

III - MISE AU POINT D'UN MOYEN D'INTRODUCTION DES SUJETS AXENIQUES EN ISOLATEUR DE TREXLER

L'étude précédente a permis de préciser certaines conditions de prélèvement puis de survie des alevins après laparatomie. L'obtention d'une espèce à l'état axénique ne pouvant être acquis qu'après reproduction des sujets axéniques, obtenus par voie chirurgicale, la poursuite éventuelle de

l'élevage ne peut se faire que dans des bacs de volume assez élevé installés dans un isolateur. Il est donc important d'étudier la technique d'introduction des alevins dans cet isolateur. Les manipulations qui suivent sont destinées à mettre au point la technologie de cette introduction et notamment à étudier les conditions que doivent remplir les enceintes intermédiaires dans lesquelles seront conservées les alevins, le temps d'un contrôle bactériologique.

III. 1. Série préliminaire : limites de la méthode

A/ Matériel et méthodes

On utilise des ampoules de 150 cc en verre Pyrex analogues à celles de LESEL R. et LESEL M. (1975) (29). Ces ampoules sont munies d'un système d'aération analogue à celui des expérimentations précédentes et sont remplies d'eau du robinet (fig. 7). Stérilisation 120°C - 30 mn.

Les sujets d'intervention appartiennent à diverses espèces : Poecilia (Mollienesia) sphenops, variétés mouchetée et noire ; Poecilia (Mollienesia) formosa ; Xiphophorus (Platypoecilus) maculatus ; Xiphophorus helleri.

La laparotomie comporte une modification de la technique précédente en vue d'éviter les contaminations d'origine rénale ou intestinale dues au caractère aveugle de la ponction ; toute la paroi abdominale latérale est réclinée soigneusement, et le sac ovarien est ponctionné au bistouri. Les alevins peuvent donc être prélevés avec plus de douceur et en presque totalité.

Le contrôle bactériologique a été réalisé sur milieu TGV₁P (Lésel M. (1976) (6) en boîte de Pétri et tubes Raibaud.

Les témoins sont placés en conditions aquariologiques normales.

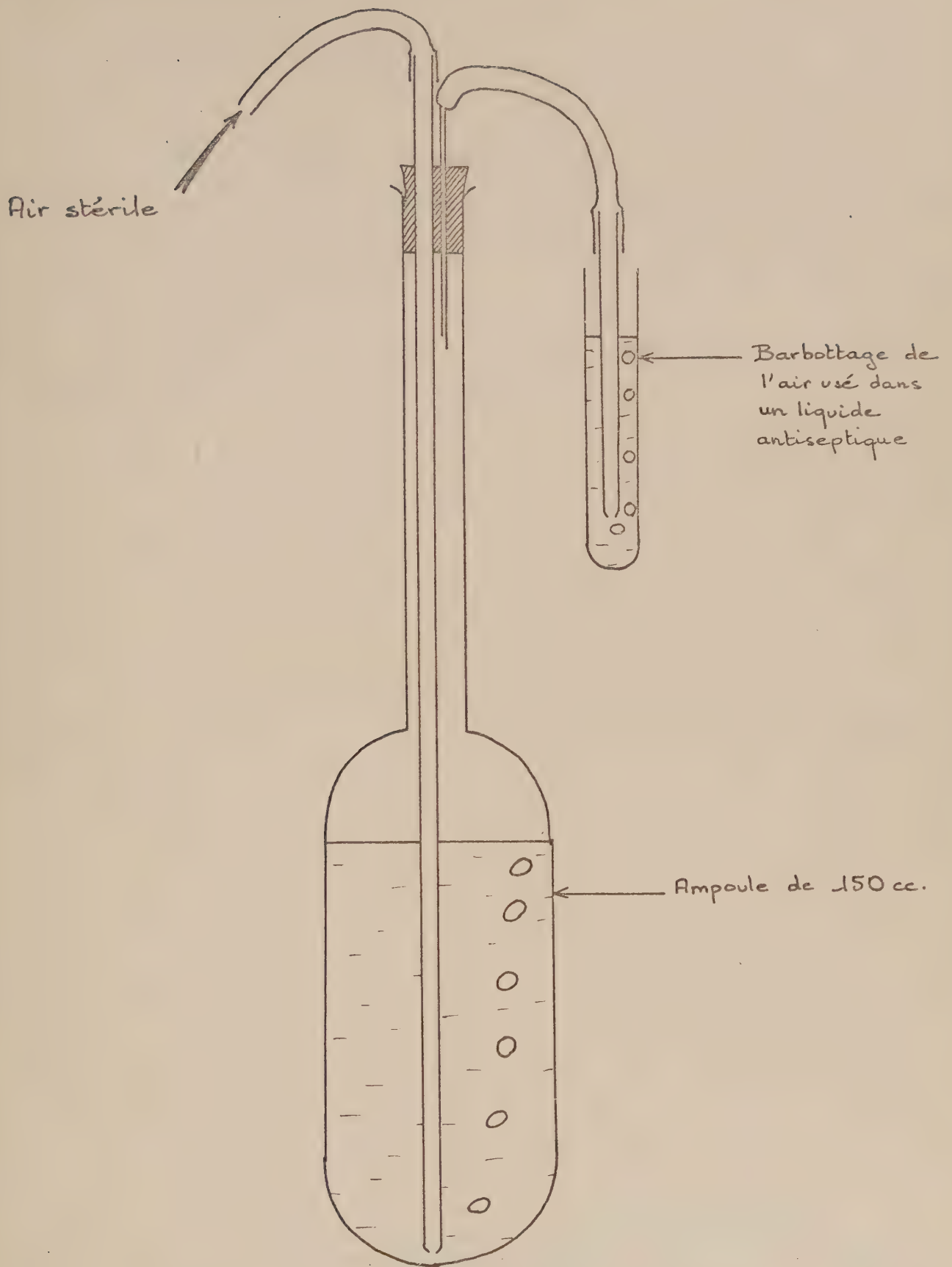


Fig. 7 - Ampoule d'élevage temporaire des alevins axéniques (150 ml)

B/ Résultats et discussion

Au cours de cette série d'expérimentations, tous les alevins axéniques meurent à la naissance ou dans les 48 heures suivantes, malgré des contrôles bactériologiques toujours négatifs. Les témoins survivent normalement.

Devant cette série d'echecs, différentes étapes de la manipulation ont été mises en cause successivement:

- = la désinfection: il semblerait que Poecilia formosa y soit plus sensible que les autres. Néanmoins, une amélioration notable des résultats a été obtenue en diminuant la durée des bains antiseptiques, sans préjudices pour la stérilité obtenue;
- = les conditions d'oxygénation du milieu et l'agitation qui en résulte: en effet, l'oxygénation dépend directement de la quantité d'air qui barbotte dans l'ampoule. Il en résulte une agitation considérable du milieu. Pour pallier cet inconvénient, les ampoules sont désormais inclinées: le trajet des bulles est moins long dans l'eau mais la surface de contact eau-air est plus importante;
- = la dureté de l'eau: il y a précipitation de CaCO_3 lors de l'autoclavage et adoucissement très marqué de l'eau. Tous les Cyprinodontidés ovovivipares ont besoin d'une eau dure, mais les Guppys axéniques détenus précédemment avaient bien supporté cette eau temporairement très adoucie; (le gaz carbonique contenu dans l'air qui barbotte remet les carbonates en solution);
- = les conditions d'environnement, très mauvaises en ampoule;

III. 2. Essai complémentaire : définition de 2 paramètres :

Volume utile et concentration saline

Cette dualité des causes nous a conduit à tester la capacité de survie des alevins conventionnels dans divers environnement. Chaque lot contenait :

- . 1 alevin de Poecilia (Mollienesia) sphenops, variété marbrée, âgé de 3 jours ;
- . 3 alevins de Poecilia (Mollienesia) formosa, âgés de 2 jours ;
- . 1 alevin de Xiphophorus helleri, noir, âgé de 1 jour, suivant la disponibilité.

Nous avons comparé d'une part, les conditionnements en ampoule de 150 cc et en flacon d'un litre, d'autre part, différentes concentrations salines pouvant éventuellement maintenir la pression osmotique du milieu liquide après stérilisation à l'autoclave.

Résultats : Tableau II

La mortalité soudaine survenue au 6ème jour dans l'ampoule contenant la solution de NaCl, à 5 p. 1000 stérilisé provient de l'interruption de l'aération du milieu au cours de la nuit du 5ème au 6ème jour.

Bien que le nombre de sujets traités dans chacun des lots soit faible, on observe que :

- . la survie est meilleure en flacon d'un litre qu'en ampoule de 150 cc ;
- . les solutions salines assurent une meilleure survie des alevins que l'eau du robinet.

Il semble donc qu'il soit nécessaire, pour obtenir de meilleurs résultats de survie, d'associer un grand volume utile et une solution saline respectant, en partie, l'équilibre ionique et osmotique des alevins.

Nombre de jours après conditionnement	0	1	2	3	4	5	6
au du robinet non stérilisée	0 4	0 4	0 4	0 4	0 4	0 4	0 4
au du robinet stérilisée	5 5	4 5	3 5	2 5	2 5	1 5	0 5
solution NaCl 2,5 p. 1000 non stérilisée	5 4	5 4	5 4	4 4	3 4	2 4	0 4
solution NaCl 2,5 p. 1000 stérilisée	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5	5 5
solution NaCl 5 p. 1000 non stérilisée	4 0	4 0	3 0	3 0	3 0	0 0	0 0
solution NaCl 5 p. 1000 stérilisée	5 0	5 0	5 0	4 0	4 0	4 0	0 0

Nb survi- vants ampoule	Nb survi- vants flacons
-------------------------------	----------------------------------

Les solutions NaCl 2,5 p. 100 et 5 p. 100 ont été
préparées avec de l'eau du robinet

TABEAU II - Effet des conditions d'environnement sur la
survie des Alevins

IV - ESSAI D'UNE ENCEINTE INTERMEDIAIRE AVANT INTRODUCTION DES ALEVINS EN ISOLATEUR

A la suite des essais précédents, nous nous sommes proposés d'étudier plus particulièrement l'influence de l'équilibre hydrominéral du milieu sur la survie de l'alevin.

A/ Matériel et méthodes (Fig. 8)

Nous avons utilisé des récipients ayant une capacité totale de un litre mais dans lequel n'est introduit que 750 cm³ de milieu liquide. Nous avons testé un milieu synthétique d'élevage, milieu préconisé par DEPECHE (1976 (58) communication personnelle) pour le développement in vitro des oeufs embryonnés de Guppy (Poecilia reticulata). Ce milieu réalisé par KEYNES et MARTINS-FERREIRA (1953) (59), milieu KMF, à la composition suivante :

NaCl	9,88 g
Kcl	0,37 g
CaCl ₂	0,33 g
MgCl ₂	0,14 g
NaH ₂ PO ₄	0,04 g
Na ₂ H PO ₄	0,17 g
Eau	1000 ml

Il s'agit d'un milieu de salinité moyenne, environ le quart de celle de l'eau de mer, sans carbonate ni bicarbonate. A la stérilisation on peut donc espérer qu'il ne se produira pas de précipitations susceptibles de nuire à la pression osmotique. Le milieu KMF est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 30 minutes.

Au cours de l'expérimentation a été testée :

- . la survie en milieu MKF stérilisé ;
- . la survie en milieu MKF non stérilisé ;
- . la survie eu eau du robinet stérilisée.

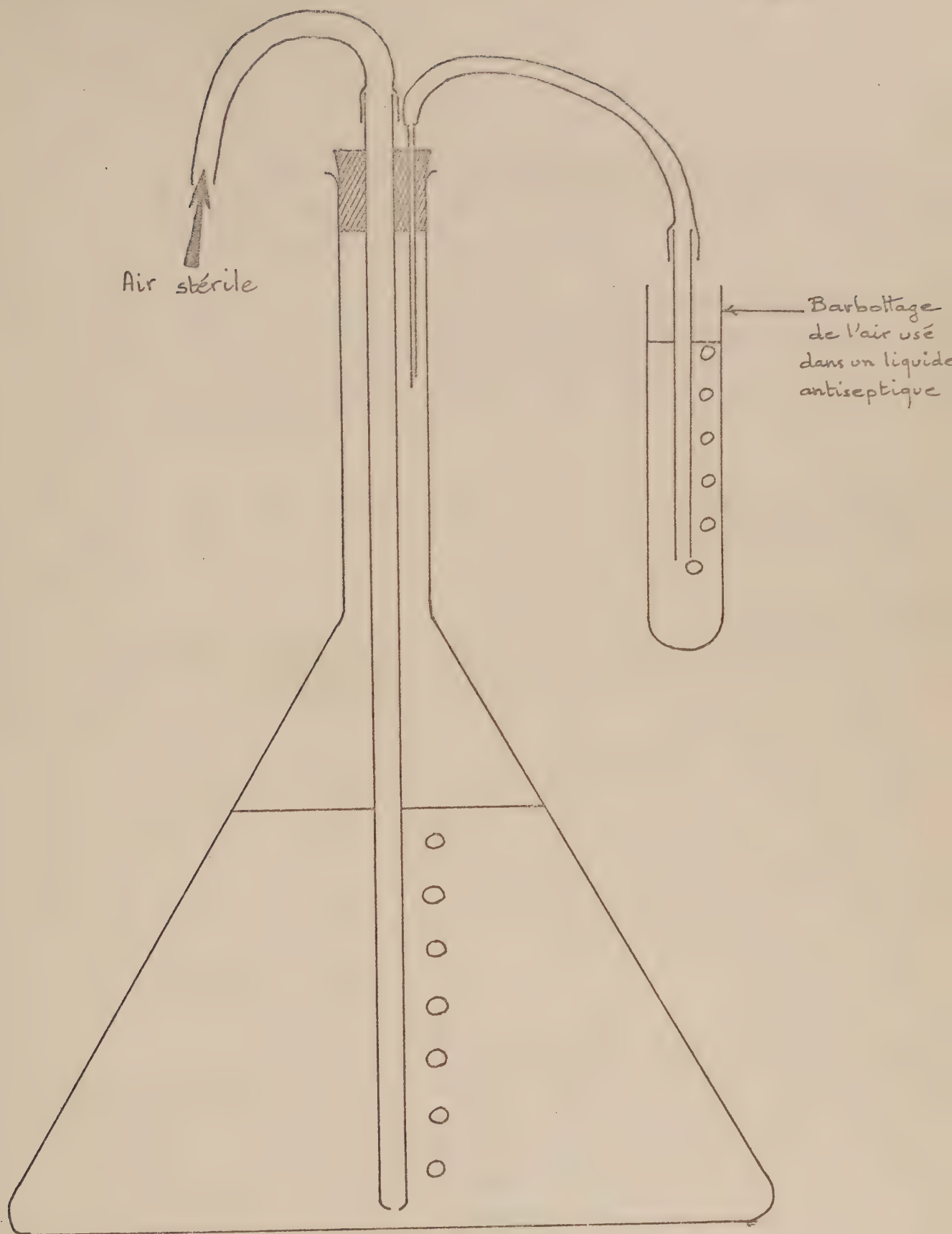


Fig. 6 - Ampoule d'élevage temporaire (1 litre)

Le système d'aération des récipients (flacon de verre de 1 litre type transfusion sanguine et ampoules en verre de un litre), est identique à celui utilisé au cours des essais précédents.

Les sujets d'intervention sont ici des Gambusies (Gambusia affinis holbrooki) acclimatés progressivement quelques jours auparavant au milieu KMF préparé à l'eau du robinet. Les jeunes sont en effet capable d'une certaine adaptation intra-folliculaire aux milieux de salinité différente.

Les jeunes nés spontanément dans ce milieu (DEPECHE et SCHOFFENIELS, 1975 (57) , ont présenté une plus grande activité et un meilleur taux de croissance que leurs homologues en eau douce.

La laparotomie s'effectue selon la technique décrite et améliorée précédemment : toute la paroi abdominale latérale de la femelle est réclinée, après la désinfection suivante :

Alcool-ether	10 secondes
Betadine	2 mn
Alcool-ether	1 rinçage

Les contrôles bactériologiques sont effectués sur milieu TVG 1 P (LESEL Michèle, 1976) en boîtes de Pétri et en tubes Raibaud.

B/ Résultats : Tableau 3

On observe que les contrôles bactériologiques effectués le 2ème puis le 5ème jour donnent des résultats négatifs dans tous les prélèvements d'eau effectués sur les lots axéniques. Ces contrôles confirment donc l'efficacité de la méthode de prélèvement par laparotomie abdominale telle que nous l'avons pratiquée. Pour sonder l'efficacité des systèmes de maintien de la stérilité dans les ampoules, nous avons refait un contrôle de stérilité au 10ème jour. Il est apparu qu'un seul lot s'était contaminé. Cette contamination bactérienne a pu intervenir au cours d'une opération de prélèvement d'eau pour le contrôle bactériologique.

INTERVENTIONS	MILIEUX D'ELEVAGE	Nombre de sujets axéniques			Nbre de sujets holoxéniques		
		Prélevés	Survivants		Prélevés	Survivants	
			2° jour	5° jour		2° jour	5° jour
1 ^{ère} intervention	Eau du robinet stérilisée	14	14	9	-	-	-
	Milieu KMF stérilisé	-	-	-	22	14	14
2 ^{ème} intervention	Milieu KTF stérilisé	12	12	12	-	-	-
	Milieu KTF non stérilisé	-	-	-	26	21	20
3 ^{ème} intervention	Milieu KMF stérilisé	20	20	20	15	10	8
4 ^{ème} intervention	Ovules embryonnés de 15 jours environ - N'ont pas été conservés						
5 ^{ème} intervention	Milieu KMF stérilisé	14	14	13	-	-	-
	Milieu KMF non stérilisé	-	-	-	31	25	24
6 ^{ème} intervention	Milieu KMF stérilisé	29	25	10	12	10	5
	Milieu KTF stérilisé	19	19	18	-	-	-
7 ^{ème} intervention	Milieu KMF non stérilisé	-	-	-	14	12	12

TABIEAU III - Obtention d'alevins axéniques de Gambusies

La forte mortalité observée lors de la 6ème intervention est due à l'immaturité des embryons prélevés environ à une semaine du terme.

On note une nette différence entre les rapports (Alevins survivants le premier jour/Alevins prélevés) des axéniques et des conventionnels. Il est dû au mode de prélèvement des alevins et au fait que les femelles ont une gestation intra-folliculaire et non pas intra-ovarienne au sens strict. Les premiers embryons prélevés sont les mieux dégagés de leur follicule et, en principe, les mieux développés. Le prélèvement des alevins suivants est plus traumatisant et occasionne vraisemblablement des lésions sur certains d'entre eux. Cette différence ne doit donc pas être, a priori, attribuée au caractère axénique ou conventionnel des alevins.

On note un taux de survie moyen de 97 p. 100 des alevins axéniques en milieu KMF, si on exclut la 6ème intervention pour laquelle les embryons ne sont pas à terme. Le taux de survie observé dans le milieu témoin (Alevins axéniques dans l'eau du robinet stérilisée, 1ère intervention) est d'environ 64 p. 100. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu précédemment lors des premières interventions sur Guppy (Poecilia reticulata) et qui était voisin de 70 p. 100.

C/ Discussion

A l'issue de cette série d'essais, on peut considérer que nous avons effectivement maîtrisé les paramètres principaux permettant par laparotomie abdominale des femelles d'espèces ovovivipares proches de l'expulsion des embryons, l'obtention d'alevins axéniques. On peut analyser la valeur de cette méthode :

1. Espèces utilisées : suivant la disponibilité du moment diverses espèces ont été manipulées. Les résultats positifs les plus nets ont été acquis sur les Gambusies, mais dans ce cas notre maîtrise de la technique était plus grande que pour les autres. En fait, ces espèces présentent une grande parenté entre elles et on peut admettre que les informations acquises sur l'une sont en grande part utilisables sur les autres.

2. Signification et limites du terme "axénie" dans le cas des alevins

L'Association Française pour la Gnotoxénie, dans son compte-rendu de la journée d'étude du 30 Avril 1976 définit ainsi le statut de l'animal axénique: "Le sujet axénique est élevé en enceinte stérile en l'absence complète de bactérie." Il n'est donc pas fait allusion aux virus.

En matière de contrôle bactériologique, les examens microscopiques n'apportent des informations intéressantes que dans le cas de bactéries mobiles; Les techniques classiques de culture en bactériologie utilisées pour le contrôle de la stérilité des enceintes apportent une information limitée. Ne se développent sur les milieux que les germes y trouvant la couverture de leurs besoins. Un milieu de culture si polyvalent soit-il ne peut couvrir les besoins de tous les groupes bactériens susceptibles de se trouver dans l'enceinte. De ce fait, dans la préparation des enceintes destinées à la manipulation de sujets gnotoxéniques, il est désormais coutumier d'utiliser une souris axénique. La colonisation éventuelle du tube digestif par une bactérie ayant échappé aux opérations de désinfection et stérilisation peut ainsi être mise en évidence. Encore faut-il que la bactérie survivante soit hétérotrophe, et se développe à 37°C. Il en résulte qu'une bactérie autotrophe et inhibée par la présence de matière organique, ou même hétérotrophe mais psychrophile ne peut être mise en évidence par l'utilisation d'un homéotherme axénique. Dans le cas des poissons, la certitude d'une bonne stérilisation ne peut être acquise que dans la mise en oeuvre rigoureuse des techniques classiques de la bactériologie. La mise au point d'un élevage axénique de poisson permettra ultérieurement de posséder un réactif biologique pour les températures faibles (5 - 7°C) ou moyennes (20 - 25°C) apportant des informations analogues à celles fournies par la souris à des températures plus élevées.

CONCLUSIONS

Les expérimentations effectuées au cours de cette série de travaux ont permis d'obtenir facilement et dans d'excellentes conditions des alevins axéniques de poissons ovovivipares. En effet, de nombreuses améliorations ont été apportées à la technique préconisée par BAKER et FERGUSON (1942) (2):

= utilisation des iodophores pour la désinfection du champ opératoire lors de la laparotomie abdominale de la femelle gestante;

= réduction des temps de désinfection, sans préjudice pour la stérilité des manipulations;

= prélèvement des alevins par laparotomie large, permettant d'éviter toute erreur de manipulation, source de contamination, et incision au bistouri du sac ovarien autorisant une aspiration plus douce des embryons;

= mise au point d'un stade intermédiaire en ampoule de verre permettant une mise en isolateur facile des alevins après le résultat des premiers contrôles bactériologiques;

= mise au point d'un filtre immergé stérilisable atténuant les effets de l'accumulation de matière organique (ammoniac notamment) par adsorption sur charbon végétal activé;

- - - / -

= obtention d'une nourriture de base équilibrée et stérile, susceptible d'être enrichie après autoclavage à l'aide de vitamines et d'acides aminés;

= possibilité d'élevage conjoint de larves Nauplius axéniques d'Artemia salina servant de nourriture vivante d'appoint;

Ces améliorations de la technique d'obtention et d'élevage des alevins axéniques devraient conduire dans un avenir proche à l'obtention d'adultes axéniques, voire à leur reproduction.

Vu :

LE DIRECTEUR

de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon,

LE PROFESSEUR RESPONSABLE

de l'École Nationale Vétérinaire,



Vu :

LE DOYEN,

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,

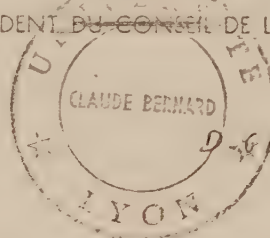


Vu et permis d'imprimer.....

LYON, le 2 DEC 1977

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ

LYON I



B I B L I O G R A P H I E

=====

- 1 - AFFRE P.Y., 1974. Le Saumon Atlantique (*Salmo salar* L.) en France et dans le monde. *Thèse de Doctorat vétérinaire* Lyon.
- 2 - BAKER J.A., FERGUSON M.S., 1942. Growth of platyfish (*Xiphophorus maculatus*) free from bacteria and other microorganisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 51, 1, 116-119.
- 3 - BAUDIN F., 1962. La pathologie pisciaire - Aperçu synthétique - Expérimentation sur une nouvelle maladie de la truite d'élevage. *Thèse Doctorat vétérinaire*, Lyon n° 7.
- 4 - BERGSTROM, 1973. The role of nutrition in growth and survival of young hatchery reared Atlantic Salmon. *I.A.S. Symposium, Spec. Publi. series*, 4, 1, 265 et 273-278.
- 5 - BURROWS R.E., 1964. Effects of accumulated excretory products on hatchery-reared salmonids. *United states Department of the interior Fish and Wildlife service, Research report n° 66*, 1-12.
- 6 - BUTTIAUX R., BEERENS H., TACQUET A., 1966. *Manuel de techniques bactériologiques*. Editions médicales Flammarion Paris.
- 7 - CARBIENER R., 1967. Aperçu de quelques effets de la pollution des eaux douces de la zone tempérée sur les biocénoses aquatiques. Ministère de l'Education Nationale, Comité des travaux historiques et scientifiques. Bulletin de la section de géographie, tome LXXX.
- 8 - DELAUNAY, 1929. cité par VELLAS F., SERFATY A., 1974 (53).
- 9 - DERANGERE M., 1975. Les maladies virales, bactériennes, parasitaires des poissons carnassiers d'eau douce, à l'exception des salmonidés. *Thèse de Doctorat vétérinaire Paris n° 98*.
- 10 - DORSON M., de KINKELIN P., 1974. Nécrose pancréatique infectieuse des salmonidés. Enquête sérologique dans les populations domestiques et sauvages. *Ann. Rech. vétér.*, 5, 2, 249-256.
- 11 - DUCLUZEAU R., RAIBAUD P., LADIRE M., RIOTTOT M., CHOPIN A., 1973. Etablissement de di-
souches de bactéries anaérobies strictes dans le tube digestif de souris et de rats
gnotoxéniques. Effet de l'animal hôte et de son régime alimentaire. *Ann. Microbiol.*
Inst. Pasteur, 124 B, 517-532.
- 12 - FADDEN T.W., Mac, 1969. Effective desinfection of trout eggs to prevent egg trans-
mission of *Aeromonas liquefaciens*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 26, 2311-2318.
- 13 - FULLER R., 1968. *The routine microbiological control of germ free isolators. The*
Germ-free animal in research. Ed. COATES M.E., Academic Press London and New-York.
- 14 - GERARD J.P., 1973. Les iodophores en pisciculture. *La pisciculture française*, 36, 4,
Fiche technique n° 2.
- 15 - GERARD J.P., de KINKELIN P., 1973. Prévention des maladies dans la conduite d'une
salmoniculture. *La pisciculture française*, 36, 4ème trimestre.
- 16 - GILBERT J., LEGGE R., 1972. *Le grand livre de l'Aquarium*. Ed. ELSEVIER SEQUOIA,
Paris/Bruxelles.
- 17 - GROS G., 1977. Les aëromonoses des Poissons. Essai d'immunisation. *Thèse Doctorat*
vétérinaire Lyon.
- 18 - GUELIN A., 1952. Bactériophages et entérobactéries chez les poissons de mer et le
problème des eaux polluées. *Ann. Inst. Pasteur*, 83, 46-56.

- 46 -
- 19 - GUELIN A., 1954. La contamination des poissons et le problème des eaux polluées. *Ann. inst. Pasteur.* 86, 303-308.
 - 20 - HUGGINS C., RAST H. Jr., 1963. Incidence of coliform bacteria in the intestinal tract of *Gambusia affinis Holbrooki* (Girard) and their habitat water. *J. Bacteriol.*, 85, 489-490.
 - 21 - JEAN-BLAIN C., 1974. Effets de la chaleur humide et de l'irradiation gamma sur différents paramètres nutritionnels d'un régime semi synthétique et d'une provende classique pour rat. *Rev. Méd. Vét. Fr.*, 125, 4, 531-539.
 - 22 - KEMP H.T., LITTLE R.L., HOLOMAN V.L., DARBY R.L., 1973. *Water quality criteria data book*. vol. 5 - *Effects of chemicals on aquatic life*. Water pollution control research series 18050 HLA 09/73 US Environmental protection agency.
 - 23 - de KINKELIN P., 1974. Corynebacterioses des salmonidés : première observation en France. *Bull. fr. Pisci.*, 47, 254.
 - 24 - LA PRAIRIE Y., 1977. *Le nouvel homme et la mer*. Edition Mengès.
 - 25 - LASSERE J., MEURILLON A., 1976. Environnement et pathologie des poissons exotiques d'eau douce. *Rec. Méd. Vet.*, 152, 11, 703-720.
 - 26 - LEPKOVSKY 1964, cité par GORDON H.A., 1968. *Is Germ-free animal normal? A review of anomalies in young and old age. The Germ-free animal in research*. Ed. COATES M.E., Academic press. London and New-York.
 - 27 - LESEL R., 1974. Compte rendu de fonctionnement du laboratoire des Microorganismes. Station d'Hydrobiologie de Biarritz.
 - 28 - LESEL R., MENET J.P., 1974. Dynamics of microflora in digestive tract of penguins and fish at Kerguelen islands. *In third Symposium of Atlantic Biology*. Août 1974.
 - 29 - LESEL R., LESEL M., 1975. Obtention d'alevins non vésiculés axéniques de salmonidés. *5ème Symposium international de gnotobiologie*. Stockholm, 9-12 Juin 1975.
 - 30 - LESEL M., 1976. Etude de la microflore du tube digestif d'un salmonidé d'élevage - Mise au point technique. *Diplôme d'Etudes supérieures de Sciences Naturelles. Université de Bordeaux I*.
 - 31 - LISTON J., 1956. Quantitative variations in the bacterial flora of Flatfish. *J. gen. Microbiol.*, 15, 305-314.
 - 32 - LISTON J., 1957. The occurrence and distribution of bacterial types on Flatfish. *J. gen. Microbiol.*, 16, 205-216.
 - 33 - MARGOLIS L., 1956. The effect of fasting on the bacterial flora of the intestine of fish. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 10, 2, 62-63.
 - 34 - MARTRAY J., 1977. Les ressources alimentaires, énergétiques et minérales de l'Océan. I - Pour une véritable politique maritime de la France. *Bulletin mensuel du Centre de Recherches économiques sociales et syndicales. C.R.E.S.*, 34, janvier, 1-11.
 - 35 - PLEASANTS J.R., 1968. *Characteristics of the Germ-free animal. The Germ-free animal in Research*. Ed. COATES M.E., Academic Press. London and New-York.
 - 36 - PORA, PRECUP (1958) cités par VELLAS F., SERFATY A., 1974 (53)
 - 37 - PORTE M., CHILMONCZYK S., 1974. Une microsporidiose des salmonidés dans le Sud-Ouest de la France. *Bull. Fr. Pisci.*, 253, 158-165.
 - 38 - POTTER F.P., BAKER G.E., 1961. The role of fish as conveyors of microorganisms in aquatic environments. *Can. J. Microbiol.*, 7, 595-605.

- 39 - SACQUET E., 1968. *General technique of maintaining germ-free animals. The germ-free animal in research*. Ed. COATES M.E., Academic press, London and New-York.
- 40 - SAINT-MARTIN B., DUCLUZEAU R., GHNASSIA J.C., GRISCELLI C., LAUVERGEON B., 1975. Amélioration de la technologie des enceintes stériles permettant leur application à la médecine et à la chirurgie. *Rev. fr. gynec.*, 70, 10, 585-593.
- 41 - SAINT-MARTIN B., 1976. Application à la médecine et à la chirurgie des enceintes stériles pour animaux axéniques. *Sci. tech. anim. lab.*, 1, 3, p. 152.
- 42 - SEKI H., 1969. Marine microorganisms associated with the food of young salmon. *Appl. Microbiol.*, 17, 2, 252-255.
- 43 - SERA H., KIMATA M., 1972. Bacterial flora in the digestive tract of marine fish. I - Bacterial flora of fish, red sea bream snapper and crimson sea bream, fed three kinds of diets. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 38, 1, 50-55.
- 44 - SHAW E.S., ARONSON L.R., 1954. Oral incubation in *Tilapia macrocephala*. *Bulletin of American Museum of Natural History*, 103, 5, 375-416.
- 45 - SHAW E.S., 1957. Potentially simple technique for rearing germ-free fish. *Sci.*, 125, 987-988.
- 46 - SHELBOURNE, 1962, cité par PELLEQUER D., 1975. Contribution à l'étude de l'Aquaculture marine. *These Doctorat vétérinaire Alfort n° 94*.
- 47 - SHEPHERD C.J., 1975. Veterinary aspects of salmonid fish farming : husbandry. *Veter. Rec. G.B.*, 97, 1, 4-6.
- 48 - SHEWAN J.M., 1949. Some bacteriological aspects of handling, processing and distribution of fish. *J. Roy. San. Inst.*, 69, p. 394.
- 49 - SMITH H.W., 1965. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors effecting its composition. *J. Peth. Bact.*, 89, 95-122.
- 50 - TARR H.L.A., 1954. Microbiological deterioration of fish post-mortem, its detection and control. *Bact. rev.*, 18, p. 1.
- 51 - TRUST T.J., 1974. Sterility of salmonid roe and practicality of hatching gnotobiotic salmonid fish. *Appl. Microbiol.*, 28, 3, 340-341.
- 52 - TRUST T.J., 1975. Facultative anaerobic bacteria in the digestive tract of Chum salmon *Oncorhynchus keta* maintained in fresh water under defined culture conditions. *Appl. Microbiol.*, 29, 663-668.
- 53 - VELLAS F., SERFATY A., 1974. L'ammoniaque et l'urée chez un téléostéen d'eau douce : la Carpe *Cyprinus carpio* L. *J. Physiol.*, 68, 6, 591-614.
- 54 - WOLF, 1963 cité par DORSON et de KINKELIN, 1974 (10).
- 55 - YAMANO T., 1975. *The medaka, Gruzias latipes and the guppy, Poecilia reticulata. Handbook of genetics*, vol. 4, *Vertebrates of genetic interest*, 133-149. Ed. KING R.C. Plenum press, New-York.
- 56 - FOURNAUD J., MORAND-FEHR C., 1965. Contribution à l'étude microbiologique de la viande bovine désossée et congelée d'origine française. Comparaison avec quelques viandes d'autre origine. Supplément au *Bull. Inst. internation. Froid*, Commission 4, Annexe 1965, 1, 63-74.
- 57 - DEPECHE J., SCHOFFENIELS E., 1975. Changes in electrolytes, ures and free amino-acid content of *Poecilia reticulata* embryos (teleost) following high salinity adaptation of the viviparous female. *Biochem. System. Ecol.*, 3, 111-119.
- 58 - DEPECHE J., 1976. Acquisition et limites de l'autonomie trophique embryonnaire au cours du développement du poisson téléostéen vivipare *Poecilia reticulata*. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique*, tome CX, 1, 45-97.
- 59 - KEYNES R.D., MARTINS-FERREIRA H., 1953. Membrane potentials in the electro plates of the electric eel. *J. Physiol.*, London, 119, 315-351.

